

METHOD AND REAGENT FOR DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE

Patent number: JP60030696
Publication date: 1985-02-16
Inventor: SAKATA YOSHITSUGU; TSUDA NAGAOMI;
TSUCHIYA MASAKAZU
Applicant: WAKO PURE CHEM IND LTD
Classification:
- **international:** C12Q1/32
- **european:**
Application number: JP19830139180 19830729
Priority number(s): JP19830139180 19830729

Abstract of JP60030696

PURPOSE:To determine creatinine or creatine, in high specificity and sensitivity, free from the influence of foreign materials, by using a determination reagent comprising a combination of a specific enzyme and a coenzyme DNA. **CONSTITUTION:**Creatinine or creatine in the specimen is made to react with a reagent comprising a combination of creatinineamide hydrolase (except for the determination of creatine), creatineamidino hydrolase, sarcosine oxidase, formaldehyde dehydrogenase, formic acid dehydrogenase and coenzyme NAD, and the produced NADH is determined.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60-30696

⑬ Int. Cl.⁴

C 12 Q 1/32

識別記号

庁内整理番号

8213-4B

⑭ 公開 昭和60年(1985)2月16日

審査請求 未請求 発明の数 4 (全8頁)

⑮ 発明の名称 クレアチニン及びクレアチンの定量方法及び定量用試薬

⑯ 特 願 昭58-139180

⑰ 出 願 昭58(1983)7月29日

⑱ 発 明 者 佐 方 由 嗣 大津市日吉台2丁目36番7号
 ⑲ 発 明 者 津 田 脩 臣 和泉市弥生町2丁目13番6号
 ⑲ 発 明 者 土 谷 正 和 伊丹市行基町4丁目60番地
 ⑰ 出 願 人 和光純薬工業株式会社 大阪市東区道修町3丁目10番地

明 細 書

1 発明の名称

クレアチニン及びクレアチンの定量方法及び定量用試薬

2 特許請求の範囲

(1) 被検試料中のクレアチニンを定量するにあたり、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素 NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を組合せて作用させ、生成する NADH を測定することを特徴とする、クレアチニンの定量方法。

(2) 被検試料中のクレアチンを定量するにあたり、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素 NAD を組合せて作用させ、生成する NADH を測定することを特徴とする、クレアチンの定量方法。

(3) クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチ

ンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素 NAD を組合せてなるクレアチニン定量用試薬。

(4) クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素 NAD を組合せてなるクレアチン定量用試薬。

3 発明の詳細な説明

本発明は、酵素法による体液中のクレアチニン及びクレアチンの定量方法及び定量用試薬に関するものである。

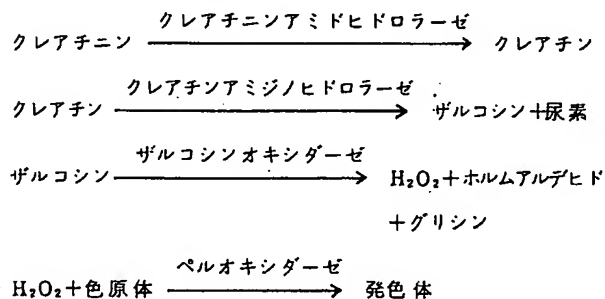
血清及び尿中のクレアチニン及びクレアチンの測定は、腎臓疾患、筋肉疾患等の診断に有用な情報をもたらす。

従来、クレアチニン及びクレアチンを定量するにあたり、アルカリ性ピクリン酸を用いるヤッフ法が用いられていたが、この方法は非特異的発色があるため測定誤差が大きく、又強アルカリ及びピクリン酸を用いるため検査器具、機器等を汚

染したり、損傷するなどの欠点を有していた。

そこで、このような欠点を解決するため、特異性が高く、測定条件の温和な酵素を利用するクレアチニン及びクレアチンの定量方法が、医薬界に於て強く要望されるようになり、種々提案されてきている。それらの主な定量方法を挙げると下記の通りである。

- a) 生成する過酸化水素量を定量する方法(特開昭57-83297号公報)



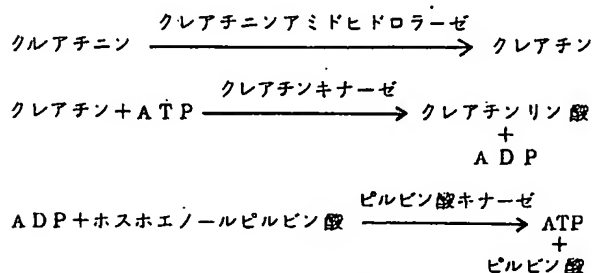
上記反応により生成する発色体を測定する。

- b) 生成するホルムアルデヒドを定量する方法(臨床検査 22巻、1331-1338(1978年))

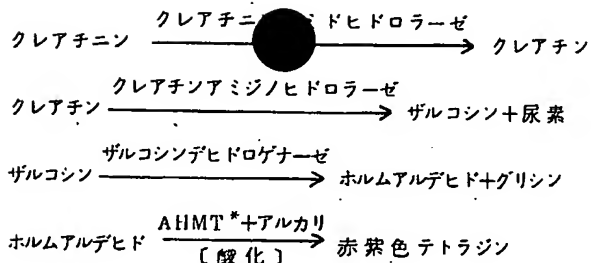
テップとなり複雑であり、又用いる各酵素にホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼの混入があると負の影響を受ける等の欠点がある。

更に、これらの欠点を有していない、酵素を利用する定量方法として下記の方法が提案されている。

- c) 消失するNADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)量を定量する方法(ベルグマイヤー, "メソーズ・オブ・エンザイマティク・アナリシス" 第2版、1787~1790頁(1974年))



上記反応により消失するNADH量を測定する。



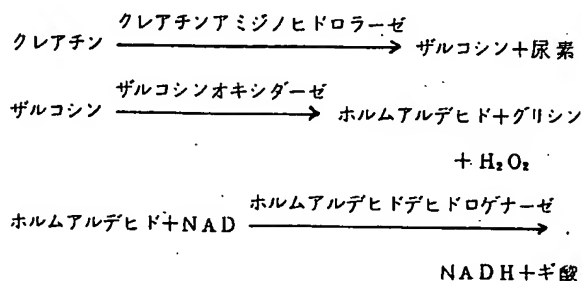
* AHMT: 4-アミノ-3-ヒドラジノ-

5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール

上記反応により生成する赤紫色テトラジンを測定する。

これらの酵素を用いるクレアチニン及びクレアチンの定量方法は、特異性が高いため正確度の高い定量ができ、又測定条件も温和であり、すぐれた定量方法であるが、しかし、測定法a)では、生じた過酸化水素をペルオキシダーゼの作用下、レドックス反応を用いて測定するため、検体中にアスコルビン酸、還元型グルタチオン等の還元性物質が共存すると、測定値が負の影響を受けるといふ欠点がある。また、測定法b)では、操作が4ス

- d) 生成するNADH量を定量する方法(日本臨床検査自動化研究会会誌、第5巻補冊、119頁(1980年))



上記反応により生成するNADH量を測定する。

測定法c)及び測定法d)は、特異性が高く、操作が簡単で、しかも試料中の共存物質の影響を受けないため非常にすぐれた定量方法であるが、しかし、これらの測定法では、1分子のクレアチンから消失するNADH又は生成するNADHは1分子であるため、測定感度が低くなってしまふ。このため低濃度検体を測定した場合、正確度の高い測定ができない。一方、血清中のクレアチニン正常値は0.9~1.5mg/dl、またクレアチン正常値は

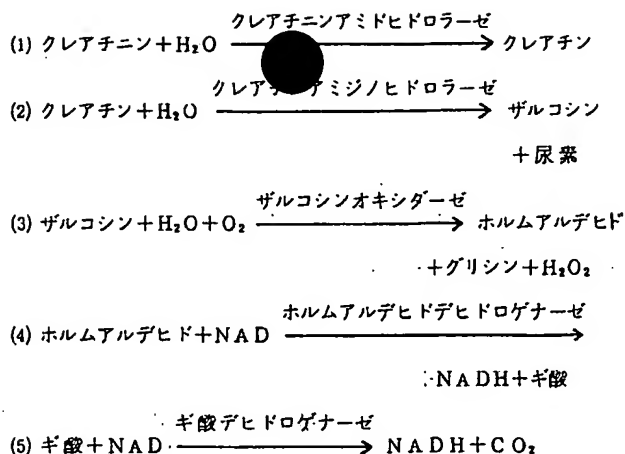
0.3 ~ 0.9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、低濃度のクレアチニン又はクレアチンを正確に定量する法の確立が要望されていた。

本発明者らは、これら a)、b)、c)、d)の方法の欠点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特異性が高く、操作が簡単で、試料中の共存物質の影響を受けない、しかも測定感度が高く、正確度の高いクレアチニン及びクレアチンの定量方法を見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びギ酸デヒドロゲナーゼ(ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド)の各酵素と補酵素 NAD を組合せて用いることにより、その目的が達成されるもので、本発明者らの独自の知見に基づき、独自の構成により完成された顕著な効果を有する発明である。

更に本発明の詳細を以下に説明する。

本発明の測定原理は下記の通りである。



上記反応(4)及び(5)で生じた NADH の紫外部吸光度を測定することにより、クレアチニン又はクレアチンを定量することができる。本発明によれば、1分子のクレアチニン又は1分子のクレアチンから生成する NADH は2分子であるため、測定感度が高く、血清等の低濃度検体を測定した場合も、正確度の高い定量が可能である。

更に本発明による優れた効果を列挙すると、(1)反応が早い、(2)短時間に定量できる、(3)5段階の

反応を同時に進行させることができるため操作が簡単である、(3)テトラゾリウム塩を用いる又は過酸化水素にペルオキシダーゼを作用させるといったレドックス反応を用いないため、検体中のアスコルビン酸などの還元性物質の影響を受けないで定量できる、等が挙げられる。

なお、クレアチン量を測定する場合は、クレアチニンアミドヒドロラーゼを用いなくて、上記反応を進行させれば測定することができる。また、検体中にクレアチニン及びクレアチンが共に存在する場合、クレアチニンアミドヒドロラーゼを用いて反応を進行させて得られるクレアチニン及びクレアチンの総量から、クレアチニンアミドヒドロラーゼを用いなくて反応を進行させて得られるクレアチン量を差し引くことにより、真のクレアチニン量を定量することができるし、逆に、先にクレアチニンアミドヒドロラーゼを用いなくて反応を進行させ生じた NADH の吸光度を測定することによりクレアチン量を定量した後、その同一試験液にクレアチニンアミドヒドロラーゼを作用

させ再度 NADH の吸光度を測定し、この値からはじめの反応によって得られた NADH の吸光度の値を差し引くことにより一液法でクレアチニンを定量することもできる。

本発明に用いるギ酸デヒドロゲナーゼについて、ベルグマイヤー、"メソーズ・オブ・エンザイマティック・アナリシス"、第2版、1551 ~ 1554 頁(1974年)にギ酸デヒドロゲナーゼによるギ酸定量法が開示されている。しかしながら、この開示からは、本発明の方法が容易に類推されるものではないことは、以下に示す通りである。

即ち、本発明の方法は、ホルムアルデヒドの作用により生じる生成物 NADH とギ酸のうちの一方の生成物であるギ酸にギ酸デヒドロゲナーゼを作用させるわけであるが、この際、もう一方の生成物である NADH による障害に関して、ヘップナー(HÖPNER)らによる"ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー"、第83巻、485 - 498 頁(1978年)に、NADH がギ酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であることが明記さ

れている。従って、ギ酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であるNADHがギ酸と当量共存している状態に於て、ギ酸にギ酸デヒドロゲナーゼを作用させても、反応が速かに進行するとは考えられず、また、ギ酸デヒドロゲナーゼの自らによる反応によってもNADHが生成してくるため、系内に於けるNADHの割合は更に増加してくるので、NADHによる反応阻害の可能性は更に高くなることが予想され、定量的に反応が進行するとは到底考えられなかった。ところが驚くべきことに、本発明法による酵素反応の組合せによりクレアチニン及びクレアチンを測定したところ、ギ酸デヒドロゲナーゼの反応も速かに進行して短時間に反応が完結し、しかも定量的にNADHが生成することが確認され、高感度で且つ正確度の高いクレアチニン及びクレアチンの定量ができることを見出し本発明を完成した。

本発明は、被検試料中のクレアチニンを定量するにあたり、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオ

キシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び酵素NADを組合せて作用させ、生成するNADHを測定することにより容易に実施をすることができ、また、被検試料中のクレアチンを定量するにあたり、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素NADを組合せて作用させ、生成するNADHを測定することにより容易に実施することができる。

更に本発明の実施態様について詳細に述べると、本発明は、被検試料中のクレアチニンを定量するにあたり、例えばクレアチニンアミドヒドロラーゼを含む液を第1液とし、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及びNADを含む液を第2液として、先ず被検試料に第1液及び第2液を加えてインキュベートし、生ずる呈色を測定し（この吸光度値を E_1 とする。）、これとは別に、被検試料に第2液を加えてインキ

ュベートし、生ずる呈色を測定し（この吸光度値を E_2 とする。）、 $(E_1 - E_2)$ よりクレアチニン量を求めることによって容易に実施することができる。

また、本発明は、被検試料中のクレアチンを定量するにあたり、例えばクレアチンアミジノヒドロラーゼを含む液を第1液とし、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及びNADを含む液を第2液として、先ず被検試料に第1液及び第2液を加えてインキュベートし、生ずる呈色を測定し（この吸光度値を E_1 とする。）、これとは別に、被検試料に第2液を加えてインキュベートし、生ずる呈色を測定し（この吸光度値を E_2 とする。）、 $(E_1 - E_2)$ よりクレアチン量を求めることによって容易に実施することができる。

本発明に用いる酵素は、いかなる起源、由来のものでもよく、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ

に関しては、通常のクレアチニン及びクレアチンの測定に於て用いられている酵素は例外なく用いられるが、それらの内の数例を挙げれば、クレアチニンアミドヒドロラーゼに於ては、例えば、アルカリゲネス属、ペニシリウム属、シュードモナス属などの微生物が産生するクレアチニンアミドヒドロラーゼがあり、クレアチンアミジノヒドロラーゼに於ては、例えば、シュードモナス属、バチルス属、アルカリゲネス属などの微生物が産生するクレアチンアミジノヒドロラーゼがある。また、ザルコシンオキシダーゼに於ては、例えば、コリネバクテリウム属、バチルス属、アルスロバクター属などの微生物が産生するザルコシンオキシダーゼがあり、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼに於ては、例えば、シュードモナス属、アルスロバクター属、シクロコッカス属などの微生物が産生するホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼがある。一方、ギ酸デヒドロゲナーゼに於ても、その起源、由来については何ら制約を受けるものではなく、例えば、シュードモナス属、カンディダ

属、クロエッケラ属などの微生物が産出するギ酸デヒドロゲナーゼが挙げられるが、これらに限定されるものではないことはいうまでもない。

本発明に於けるクレアチニン及び(又は)クレアチン測定時のpHは、一般には6.5~8.5の範囲、好ましくはpH8付近で行われ、又その為の緩衝剤としては自公知の緩衝剤、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッドバッファーなどが例外なく用いられるが、通常リン酸緩衝液がよく用いられる。

かくして、本発明は、簡単な操作で、感度よく、又共存物質の影響を受けず、正確度の高いクレアチニンの定量方法を提供するものであり、臨床検査の診断分野に於て貢献するところ甚だ大なるものがある。

以下に実施例を示し、更に詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例1. 血清中のクレアチニンの定量
定量用試薬

酵素試液A: クレアチニンアミドヒドロラーゼ

550単位。下記緩衝液で全量10mlにする。

酵素試液B: クレアチンミジノヒドロラーゼ

125単位、ザルコシンオキシダーゼ 50単位、

ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ 3単位、ギ

酸デヒドロゲナーゼ 5単位、NAD 5mg。下

記緩衝液で全量10mlにする。

緩衝液: トリトンX-100 40mg。0.1Mリ

ン酸緩衝液(pH8.0)で全量40mlにする。

定量法

血清又はクレアチニン標準液 100μlをとり、

これに上記酵素試液A 0.5ml及び酵素試液B

1.5mlを加え、37℃で10分間反応させる。こ

れらとは別に血清又はクレアチニン標準液の代り

に精製水を用いて同様の操作を行ない、試液ブラ

ンク溶液を調製する。この試液ブランク溶液を対

照として、波長340nmの吸光度を測定する。

その吸光度値をEs及びEstdとする。また、血清

100μlに上記緩衝液0.5ml及び酵素試液B

1.5mlを加え、37℃で10分間加熱後、試液ブ

ランク溶液を対照として、波長340nmの吸光

度を測定する。その吸光度値をE_sとする。血清中のクレアチニン量は(E_s - E_b)とE_{std}とを比較することによって求める。第1図にその検量線を示す。

実施例1.の方法で血清中のクレアチニン量を求め、従来から用いられているヤッフエ法の測定値と比較した。ヤッフエ法とは、ピクリン酸とクレアチニンがアルカリ中で作る橙赤色の付加化合物の波長520nmの吸光度を測定して、試料中のクレアチニン量を求める方法である。この結果を第1表に示す。

本発明方法は従来のヤッフエ法と比較して特異的な反応を用いるため、正確度の高い測定を行なうことができる。

以下空白

第 1 表

試料 No.	本発明方法 (mg/dl)	ヤッフエ法 (mg/dl)
1	0.95	1.10
2	1.08	1.15
3	0.79	0.92
4	1.22	1.29
5	0.54	0.73
6	0.73	0.88
7	1.60	1.62
8	1.12	1.24
9	0.49	0.68
10	0.90	1.05

実施例2. 血清中のクレアチニンの定量

定量用試薬

酵素試液A: クレアチンアミジノヒドロラーゼ

350単位。下記緩衝液で全量10mlにする。

酵素試液B: ザルコシンオキシダーゼ 50単位、

ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ 3単位、ギ

酸デヒドロゲナーゼ 5単位、NAD 5mg。下記緩衝液で全量10mlにする。

緩衝液：トリトンX-100 40mg。0.1Mリン酸緩衝液(pH 8.0)で全量40mlにする。

定量法

血清又はクレアチン標準液 100mlをとり、これに上記酵素試液A 0.5ml及び酵素試液B 1.5mlを加え、37℃で10分間反応させる。これらとは別に血清又はクレアチン標準液の代りに精製水を用いて同様の操作を行ない、試液ブランク溶液を調製する。この試液ブランク溶液を対照として、波長340nmの吸光度を測定する。その吸光度をEs及びEstdとする。また、血清 100μlに上記緩衝液0.5ml及び酵素試液B 1.5mlを加え、37℃で10分間加熱後、試液ブランク溶液を対照として、波長340nmの吸光度を測定する。その吸光度値をEbとする。血清中のクレアチン量は(Es - Eb)とEstdとを比較することによって求める。第2図にその検量線を示す。

第 2 表

測定 No.	本 発 明 方 法		ギ酸デヒドロゲナーゼ を除いた方法	
	Es - Eb	クレアチニン 量 (mg/dl)	Es - Eb	クレアチニン 量 (mg/dl)
1	0.035	0.70	0.020	0.80
2	0.042	0.84	0.024	0.96
3	0.038	0.76	0.014	0.56
4	0.033	0.66	0.022	0.88
5	0.044	0.88	0.018	0.72
6	0.037	0.74	0.021	0.84
7	0.039	0.78	0.019	0.76
8	0.036	0.72	0.015	0.60
9	0.041	0.82	0.017	0.68
10	0.039	0.78	0.024	0.96
11	0.038	0.76	0.015	0.60
平均値	——	0.767	——	0.76
偏差値	——	0.063	——	0.142
C.V 値(%)	——	8.2%	——	18.2%

比較例1. 血清中のクレアチンの定量〔従来法〕
定量用試薬

酵素試液A：実施例2. に同じ。

酵素試液B：実施例2. の組成からギ酸デヒドロゲナーゼを除いたもの。

緩衝液：実施例2. に同じ。

定量法

実施例2. に同じ。

第3図に比較例1の検量線を示す。

第2図及び第3図から明らかなように、本発明はギ酸デヒドロゲナーゼを用いない場合に比べて、感度が高くなっている。

実施例3. 血清中のクレアチニンの定量

実施例1. の方法とその試液中ギ酸デヒドロゲナーゼを除いた試液を用いた方法とで、同じ血清中のクレアチニンを繰り返し測定した。その結果を第2表に示す。

以下余白

以上の結果より明らかなように、本発明方法は測定感度が高く、ギ酸デヒドロゲナーゼを除いた測定法と比べて再現性が高く、正確度の高い測定が可能である。

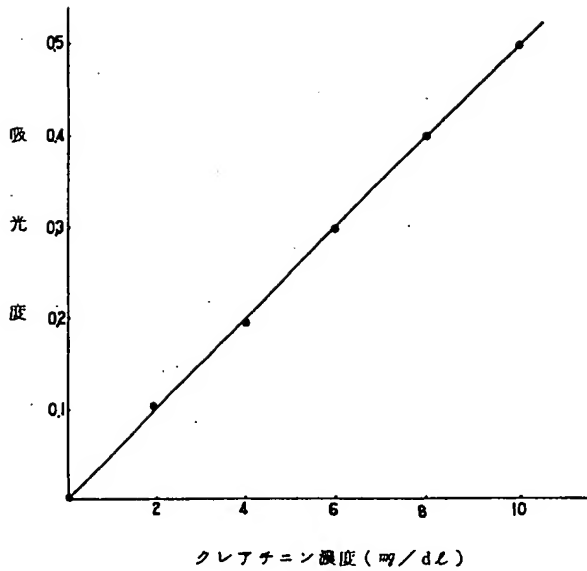
4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1に於ける検量線を表わし、横軸はクレアチニン濃度(mg/dl)縦軸は340nmに於ける吸光度を表わす。

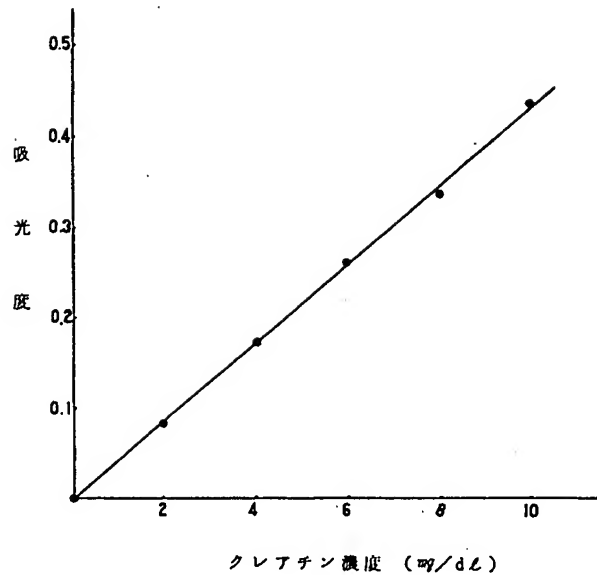
第2図、第3図はそれぞれ実施例2. 比較例1. に於ける検量線を表わし、いずれも横軸はクレアチニン濃度(mg/dl)縦軸は340nmに於ける吸光度を表わす。

特許出願人 和光純薬工業株式会社

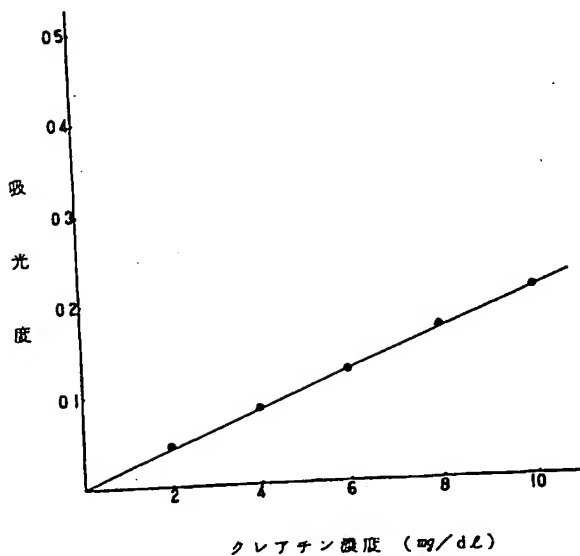
第 1 図



第 2 図



第 3 図



手続補正書

昭和59年10月15日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許願第139180号

2. 発明の名称

クレアチニン及びクレアチンの定量方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住 所 大阪府大阪市東区道修町3丁目10番地
連絡先 特許課(東京) TEL 03-270-8571

名 称 和光純薬工業株式会社

代 表 者 伊 力 一 生

4. 補正命令の日付

自 発



5. 補正により減少する発明の数 2

6. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄、特許請求の範囲の欄及び発明の詳細な説明の欄。

7. 補正の内容

- (1) 発明の名称の欄に記載の「クレアチニン及びクレアチンの定量方法及び定量用試薬」を「クレアチニン及びクレアチンの定量方法」と補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
- (3) 明細書14頁16行目に記載の「シクロコッカス属」を「マイクロコッカス属」と補正する。
- (4) 明細書19頁6行目に記載の「血清又はクレアチン標準液100 ml」を「血清又はクレアチン標準液100 μ l」と補正する。

以上

2. 特許請求の範囲

- (1) 被検試料中のクレアチニンを定量するにあたり、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素NAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を組合せて作用させ、生成するNADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を測定することを特徴とする、クレアチニンの定量方法。
- (2) 被検試料中のクレアチンを定量するにあたり、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ及び補酵素NADを組合せて作用させ、生成するNADHを測定することを特徴とする、クレアチンの定量方法。

以上